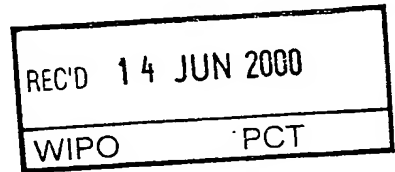
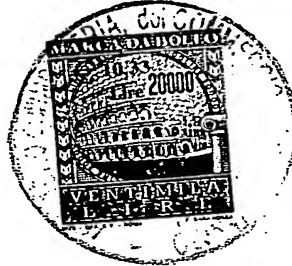


MODULARIO
ICA - 101

EP 00/03586

MINISTERO DELL'INDUSTRIA, DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO
DIREZIONE GENERALE DELLA PRODUZIONE INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI



Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per **INV. IND.**

N. MI99 A 000842

*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito*

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Roma, li 14 MAR 2000

IL DIRETTORE DELLA DIVISIONE

Ing. ROMANI

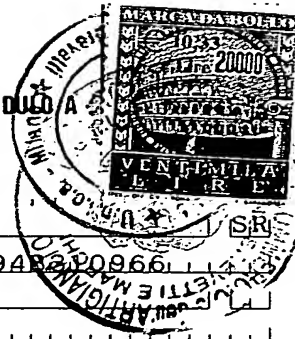
Giuseppe Romani

AL MINISTERO DELL'INDUSTRIA DEL COMMERCIO E DELL'ARTIGIANATO

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A



A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione ECOSER S.r.l.
 Residenza CORREZZANA (MI) codice 009483/00966
 2) Denominazione _____
 Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Dr. Diego Pallini ed altri cod. fiscale _____
 denominazione studio di appartenenza Notarbartolo & Gervasi S.p.A.
 via C.so di Porta Vittoria n. 9 città Milano cap. 20122 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap. _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scd) C12N gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

Microrganismi inattivati comprendenti sostanze solubili e/o solubilizzabili ad
attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica,
processo per la loro preparazione e loro uso.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☐

SE ISTANZA: DATA _____/_____/_____ N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

1) GRABITZ ERNST BERNHARD 3) _____
 2) _____ 4) _____

F. PRIORITÀ

| nazione o organizzazione | tipo di priorità | numero di domanda | data di deposito | allegato S/R | SCIOGLIMENTO RISERVE Data N° Protocollo |
|--------------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------|--|
| 1) <u>Nessuna</u> | | | | | |
| 2) _____ | | | | | |

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

Nessuna

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

| N. es. | Doc. | Prov. | N. pag. | N. tav. | Descrizione | SCIOGLIMENTO RISERVE Data N° Protocollo |
|--------|-------------------------------------|-------|---------|---------|---|--|
| 1) | <input checked="" type="checkbox"/> | PROV | 44 | | riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare) | |
| 2) | <input checked="" type="checkbox"/> | PROV | 00 | | disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare) | |
| 3) | <input checked="" type="checkbox"/> | RIS | | | lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale | |
| 4) | <input checked="" type="checkbox"/> | RIS | | | designazione inventore | |
| 5) | <input checked="" type="checkbox"/> | RIS | | | documenti di priorità con traduzione in italiano | |
| 6) | <input checked="" type="checkbox"/> | RIS | | | autorizzazione o atto di cessione | |
| 7) | <input checked="" type="checkbox"/> | | | | nominativo completo del richiedente | |

8) attestati di versamento, totale lire Cinquecentosessantacinquemila.= obbligatorio

COMPILATO IL 22/04/1999 FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I) Diego Pallini

CONTINUA SI/NO NO

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO SI

UFFICIO PROVINCIALE IND. COMM. ART. DI MILANO codice 15

VERBALE DI DEPOSITO NUMERO DI DOMANDA MI99A-000842 Reg. A.

L'anno millenovecento NOVANTANOVE, il giorno VENTIDUE, del mese di APRILE

il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda, corredata di n. 100 fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE _____

IL DEPOSITANTE

timbro
dell'Ufficio

L'UFFICIALE ROGANTE

 CORTONESI MAURIZIO

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M199A000 842

REG. A

DATA DI DEPOSITO

22/04/1999

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

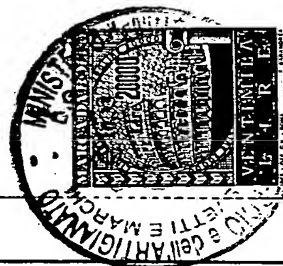
/ / /

D. TITOLO

Microrganismi inattivati comprendenti sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica, processo per la loro preparazione e loro uso.

L. RIASSUNTO

Sono descritti microrganismi inattivati comprendenti agenti farmacologicamente attivi per l'organismo umano o animale. E' inoltre descritto un processo per la preparazione di detti organismi e il loro uso, come farmaci, integratori o sostanze nutrizionali in genere nell'alimentazione sia umana che animale.



M. DISEGNO

Domanda di brevetto per Invenzione Industriale dal Titolo:

"Microrganismi inattivati comprendenti sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica, processo per la loro preparazione e loro uso."

Titolare: ECOSER Srl

MI 99 A 000842

con sede in: CORREZZANA (MI)

Inventori designati: GRABITZ Ernst Bernhard

Depositata il

con il N.

22 APR. 1999

* * * * *

Campo dell'Invenzione

La presente invenzione riguarda microrganismi inattivati comprendenti sostanze solubili e/o solubilizzabili aventi attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica che vengono assorbiti nella circolazione sistemica dell'organismo umano o animale. E' descritto un processo per la loro preparazione e il loro uso.

Stato della tecnica

I composti generalmente noti come sostanze solubili e/o solubilizzabili aventi attività farmacologica e le sostanze nutrizionali aventi attività farmacologica si riferiscono ad agenti attivi e/o sostanze che necessitano, per esplicare la loro attività, di penetrare nella circolazione sistemica dell'organismo animale o umano.

Le sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica comprendono, ad esempio, farmaci in genere e vaccini

Le sostanze nutrizionali ad attività farmacologica comprendono, ad esempio vitamine, amino acidi, ed integratori alimentari in genere. ecc.

Le sostanze farmacologicamente attive e le sostanze nutrizionali farmacologicamente attive che prevedono la somministrazione orale necessitano di arrivare in forma integra ed attiva a livello dell'intestino e di poter essere correttamente processati, penetrare nel circolo sistemico ed esplicare la loro funzione farmacologica o nutritiva in maniera efficace.

La somministrazione orale di farmaci presenta diversi seri problemi, come: emesi risultante dall'irritazione della mucosa gastrointestinale, distruzione di alcuni farmaci da parte degli enzimi digestivi o a causa del basso pH gastrico, irregolarità nell'assorbimento o nella peristalsi in presenza di cibo o di altri farmaci, inoltre i farmaci nel tratto gastrointestinale possono essere metabolizzati da enzimi della mucosa, dalla flora intestinale o dal fegato prima di raggiungere la circolazione generale.

In particolare, l'ampio intervallo di pH che si incontra nel tratto gastrointestinale può influenzare la velocità di assorbimento, alterando le concentrazioni relative di forme ionizzate e forme non ionizzate.

Quindi, i farmaci e gli agenti nutrizionalmente attivi somministrati per via orale presentano il serio problema che durante il passaggio nel tratto gastrico possano perdere del tutto o parzialmente la loro efficacia farmacologica e/o attività nutrizionale o che la loro biodisponibilità in circolo ne venga compromessa.

Un ulteriore problema è quello della termostabilità degli agenti attivi. Infatti, una modalità di somministrazione di detti agenti attivi consiste nel mescolarli con degli alimenti, per facilitarne l'ingerimento da parte

dell'uomo o dell'animale. Molte preparazioni alimentari richiedono, al momento della somministrazione, il riscaldamento (in alcuni casi anche la bollitura), e questo comporta, di conseguenza, la denaturazione o termo-inattivazione di quegli agenti attivi termolabili.

Inoltre, i farmaci ed i nutrienti dotati di spiccate caratteristiche di idrofilia (solubilità in acqua), quali ad esempio le vitamine C, B12, molti antibiotici ed antibatterici, non possono essere somministrati in specie animali ittiche a causa della loro solubilità nel mezzo acquoso, anche se miscelati a nutrienti.

Esiste quindi un problema tecnico nell'arte che consiste nel fornire al tratto sistemico dell'organismo animale o umano composti attivi, come agenti farmacologicamente e/o nutrizionalmente attivi ingeriti per via orale, che mantengano in forma inalterata le proprie capacità farmaceutiche o nutritive, evitando così gli inconvenienti dovuti all'attraversamento del tratto gastrico. Inoltre, evitare che tali agenti attivi possano alterarsi durante la preparazione prima della somministrazione.

La domanda di brevetto EP 0 899326 descrive l'uso di un lievito per il trasporto e la liberazione di enzimi digestivi esogeni nello stomaco. L'aggiunta di enzimi esogeni nello stomaco risulta importante soprattutto nel caso di animali sottoposti ad iperalimentazione ed a trattamenti farmacologicamente intensi, a scopo preventivo, in quanto digeriscono il cibo e i farmaci. Inoltre, i microrganismi così ottenuti possono essere mescolati nelle composizioni alimentari ed iniziare la pre-digestione di queste composizioni nel tratto gastrico.

Come risulta chiaro, il metodo descritto in EP 0 899326 si rivolge alla

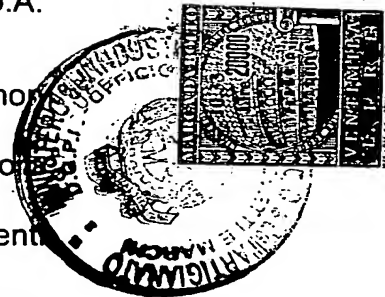
protezione esclusivamente di enzimi digestivi (cioè sostanze che non sono farmacologicamente o nutrizionalmente attive) e alla loro liberazione nello stomaco, e quindi al loro uso come adiuvanti di alimenti o farmaci in eccesso per facilitare la digestione di tali sostanze nutritive o farmaci.

Al contrario, il problema che la presente invenzione intende risolvere è quello di trasportare agenti attivi (agenti farmacologicamente e nutrizionalmente attivi) in forma protetta fino all'intestino, cioè al sito di penetrazione nel circolo sistemico ed evitare che, fino a quel momento, essi vengano modificati, inattivati o anche parzialmente digeriti da enzimi digestivi e dall'ambiente gastrico.

Sommario dell'Invenzione

Gli autori della presente invenzione hanno risolto questi problemi tecnici e hanno realizzato dei microrganismi inattivati comprendenti sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica (agenti farmacologicamente attivi) e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica (agenti nutrizionalmente attivi). Detti microrganismi così modificati vengono utilizzati per proteggere detti agenti attivi durante il loro passaggio nello stomaco ed a trasportare e rilasciare nell'intestino detti agenti attivi i quali vengono così assorbiti dalla circolazione sistemica dell'animale o dell'uomo.

Secondo un primo aspetto, pertanto, la presente invenzione si riferisce a microrganismi inattivati comprendenti sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica, come ad esempio farmaci o vaccini, agenti



nutrizionalmente attivi in genere, vitamine, amino acidi, ecc.

Secondo un altro aspetto, l'invenzione si riferisce ad un processo per la preparazione di microrganismi inattivati secondo l'invenzione comprendente le fasi di:

- i) fuoriuscita della massa endocellulare di un opportuno microrganismo mediante trattamento iperosmotico;
- ii) eventuale inattivazione del microrganismo ottenuto alla fase i) per via chimica o fisica, lasciando inalterata la membrana esterna del microrganismo stesso;
- iii) inserimento intracellulare di uno o più sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica nel microrganismo inattivato ottenuto allo stadio i) o ii) mediante trattamento ipotonico o isoosmotico.

Secondo una ulteriore realizzazione, nella fase i) avviene la fuoriuscita della massa endocellulare per mezzo di una soluzione in cui l'ipertonicità è data dal principio farmacologicamente attivo.

Secondo ancora una ulteriore realizzazione, l'invenzione si riferisce ad un processo in cui l'introduzione del principio attivo nel microrganismo avviene in presenza di soluzione isotonica nella fase (I) del processo.

Secondo un ulteriore caratteristica, l'invenzione si riferisce all'uso di microrganismi inattivati secondo l'invenzione nell'alimentazione umana o animale o anche come componenti di mangimi o premix.

La presente invenzione, inoltre, si riferisce ad una composizione comprendente una quantità efficace di uno o più tipi di organismi preparati secondo l'invenzione.

Descrizione dettagliata dell'Invenzione

La presente invenzione consente la somministrazione, per via orale, di sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica, incorporati all'interno delle pareti cellulari di microrganismi inattivati, ossia "uccisi", in grado di proteggerne le caratteristiche strutturali e di attività. Gli agenti attivi così protetti arrivano a livello dell'intestino e una volta liberati entrano nel circolo sistemico e quindi possono esplicare la propria attività.

Microrganismi

I microrganismi utilizzati nel processo secondo la presente invenzione devono essere microrganismi con buona resistenza a stress chimici e chimico-fisici. Detti microrganismi possono venire selezionati anche in base alle caratteristiche di affinità e tollerabilità nei confronti degli organismi ospiti.

Tra i microrganismi noti e reperibili commercialmente, risulta ad esempio preferito il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, avente caratteristiche di resistenza strutturale all'attacco di agenti chimici e chimico-fisici, in grado di raggiungere inalterato l'intestino, dove avviene la liberazione degli agenti attivi secondo l'invenzione e questi vengono assunti nella circolazione sistemica dell'organismo animale o umano.

Alcuni microrganismi che possono essere utilizzati sono, ad esempio quelli normalmente abitatori della microflora intestinale quali *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus* sp., facilmente reperibili in commercio.

Possono anche essere utilizzati i così detti microrganismi "volgari", isolati da materiale fecale umano, appartenenti alla flora intestinale

cosiddetta "buona", oppure da materiale ruminale, enterico o fecale della flora intestinale "buona" e di altre fonti delle diverse specie animali di allevamento. L'isolamento avviene secondo metodologie note nello stato dell'arte, per sviluppo della microflora in coltura di nutriente e successiva selezione delle colonie sulla base delle loro caratteristiche morfologiche e tassonomiche. La caratterizzazione dei ceppi isolati avviene secondo metodologie comunemente utilizzate, ad esempio dall'analisi della colorazione di Gram, del comportamento metabolico, della produzione di prodotti chimici caratteristici e delle caratteristiche nutritive.

Ulteriori microrganismi vantaggiosamente utilizzabili nel processo dell'invenzione, nonché alcune delle loro fonti, sono riportati in *Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook*, B. Atkinson e F. Mavituna Eds., 1991, MacMillan Publ., Cap. 6.1, 6.7 e 9.5.

Agenti attivi

Le sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e le sostanze nutrizionali ad attività farmacologica secondo l'invenzione, vengono definiti come segue.

Le sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica secondo l'invenzione comprendono, ad esempio tutte le sostanze farmaceutiche, antibiotici, antibatterici, ormoni, antiinfiammatori, antivirali, antifungini, antiparassitari, ed altri, e vaccini purché solubili e/o solubilizzabili, in mezzo acquoso.

Le sostanze nutrizionali ad attività farmacologica comprendono ad esempio vitamine, amino acidi, integratori alimentari di varia natura,



principi attivi di origine vegetale e/o le sostanze conosciute come "neutriceuticals" (neutriceutici), ad esempio, bioflavonoidi come la quercetina sodica, la catechina, l'isocatechina, i flavani, le cianine, i polifenoli, i polialcoli alifatici, il resveratrolo, l'acido liperico, i rutinoidi, ecc.

Processo di preparazione

La preparazione dei microrganismi inattivati comprendenti sostanze solubili e/o solubilizzabili e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica secondo l'invenzione comprendente le fasi di:

- i) fuoriuscita (svuotamento) della massa endocellulare di un opportuno microrganismo mediante trattamento iperosmotico;
- ii) eventuale inattivazione del microrganismo ottenuto alla fase i) per via chimica o fisica, lasciando inalterata la membrana esterna del microrganismo stesso;
- iii) inserimento intracellulare di uno o più sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica nel microrganismo inattivato ottenuto allo stadio i) o ii) mediante trattamento ipo- o isoosmotico.

Prima della fase di svuotamento (i), i microrganismi possono venire fatti crescere in opportuni fermentatori, secondo i metodi e le condizioni noti nello stato dell'arte, separando la massa microrganica dal mezzo di coltura alla fine della fase di crescita, mediante filtrazione o centrifugazione. Un esempio delle condizioni operative sono riportate in Biochemical Engineering and Biotechnology Handbook, B. Atkinson e F. Mavituna Eds., 1991, MacMillan Publ., Cap. 6.7.

Nella fase (i) di svuotamento, la massa endocellulare viene fatta fuoriuscire dalle pareti cellulari microorganiche mediante trattamento iperosmotico di "spremitura" dei microrganismi ottenuti come sopra descritto.

La fase (i) avviene per sospensione della massa microorganica in una soluzione acquosa ipertonica.

La soluzione acquosa ipertonica può comprendere:

- NaCl in concentrazioni superiori a 0,2M, preferibilmente 2,0M;

- ~~- eventualmente lo ione citrato che ha la funzione di contribuire~~
all'allargamento dei pori di membrana; pur non essendo strettamente indispensabile ~~è sempre meglio che ci sia citrato di sodio in~~
concentrazioni da 0,03 a 0,07M, preferibilmente 0,05M.

Preferibilmente, ~~la suddetta soluzione ipertonica comprende~~ NaCl 2,0M, citrato di sodio 0,5M.

Eventualmente può essere aggiunto un opportuno agente antibatterico, oppure polifosfati o para-benzoati.

La sospensione così ottenuta viene quindi mantenuta sotto agitazione ad una temperatura compresa tra 2 e 8°C, preferibilmente a 4°C, per un periodo variabile da 2 ore a 4 giorni, preferibilmente 72 ore, ottenendo la spremitura dei microrganismi, in quanto il contenuto endocellulare viene estruso nel mezzo ipertonico.

I microrganismi così svuotati ~~e ridotti alle sole~~ pareti cellulari risultano più piccoli del normale ed i pori di membrana risultano allargati; essi possono venire separati dalla massa endocellulare fuoriuscita nel mezzo di sospensione mediante tecniche note nello

stato dell'arte, e preferibilmente mediante filtrazione o centrifugazione.

Il controllo dello svuotamento delle pareti microorganiche può venire agevolmente eseguito mediante valutazione microscopica morfologica delle pareti stesse, che devono risultare rimpicciolite e raggrinzite. Terminata la fase di svuotamento, il mezzo di sospensione (i.e. il tampone ipertonico ed il contenuto endocellulare fuoriuscito) può venire separato dai microrganismi svuotati mediante centrifugazione a 8.000-12.000 rpm, preferibilmente 10.000 rpm.

I centrifugati possono essere eventualmente lavati. In particolare, sono utilizzati negli esempi nella aliquota utilizzata come controllo analitico della quantità di principio attivo incorporato

Nella fase (ii), i microrganismi svuotati della massa endocellulare possono venire inattivati, ossia uccisi, mediante opportuni trattamenti chimici o fisici. Tale trattamento può non essere necessario per alcuni microrganismi, in quanto il trattamento ipertonico (i) si dimostra in molti casi già sufficiente ad inattivare le cellule. Pertanto, tale fase (ii) può venire condotta dopo aver preventivamente verificato lo stato di inattivazione dei microrganismi ottenuti dalla fase (i).

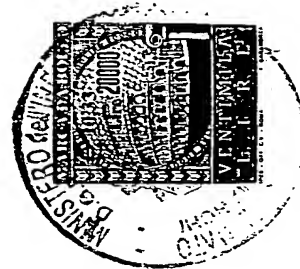
Tra i metodi chimici preferibilmente utilizzati per microrganismi aventi pareti cellulari facilmente degradabili al calore, possono essere utilizzati i trattamenti con sostanze disinfettanti ad esempio la formalina, in concentrazioni di 0,05-0,2 mg/l, per un tempo di 2-12 ore, preferibilmente alla concentrazione di 0,1mg/l, per un tempo di 6-8 ore. Tale inattivazione chimica può avvenire anche durante la fase precedente di svuotamento, per aggiunta alla soluzione ipertonica delle

sudette sostanze disinfettanti.

I trattamenti fisici comprendono preferibilmente l'esposizione a raggi UV e l'inattivazione termica, per riscaldamento della sospensione ottenuta dalla fase (i) ad una temperatura compresa tra 55 e 65°C, preferibilmente 60°C, ed isolando infine i microrganismi inattivati per concentrazione e filtrazione.

Tale trattamento può essere effettuato anche all'inizio della fase (iii) di reinserimento intracellulare in mezzo ipo- o isotonico. In tale caso, i microrganismi svuotati ottenuti dalla fase (i) vengono sospesi in una parte del mezzo ipo- o isotonico contenente le sostanze da reincorporare e la miscela così ottenuta viene quindi scaldata alle condizioni sopra riportate; dopo raffreddamento a 2-8°C, preferibilmente 4°C, si aggiunge la rimanente parte del mezzo ipo- o isotonico e si procede alla fase di inserimento intracellulare, come descritto alla fase (iii).

Le condizioni di inattivazione devono essere tali da non provocare alterazioni della struttura parietale del microrganismo e pertanto vanno scelte in funzione delle caratteristiche di resistenza del microrganismo stesso. Il controllo del grado di inattivazione delle cellule microorganiche al termine della fase (ii) può venire effettuato mediante prove di coltura, come segue: una piccola aliquota di cellule microorganiche trattate vengono risospese in parte della massa endocellulare previamente estratta, dopo dialisi della stessa per l'eliminazione dei sali e dopo, quando necessario, aver ristabilito l'isotonicità. Quando le cellule hanno riacquisito la forma originaria, 1g o 1ml circa della loro sospensione



viene inoculato in un mezzo di crescita selettivo (15-25ml circa di brodo di crescita) e sono lasciate in incubazione (a 37°C circa per i batteri; a 25°C circa nel caso di miceti) per 36-48 ore. Poiché questa prima fase può non essere sufficiente a restituire totalmente vitalità al microrganismo, la semina può venire ripetuta per ulteriori trapianti successivi (preferibilmente 3), utilizzando il brodo ottenuto dal primo stadio. Eventuali processi di crescita sono controllati analizzando la concentrazione delle colonie presenti, mediante analisi turbidimetrica, o al microscopio (su vetrino dopo colorazione), o mediante l'uso di conta colonie.

Nella fase (iii) si ha l'inserimento intracellulare, nelle cellule microrganiche inattivate, di uno o più degli agenti attivi secondo l'invenzione, mediante trattamento di dette cellule inattivate in una sospensione acquosa ipo- o isotonica contenente agenti farmacologicamente e/o nutrizionalmente attivi, sotto leggera agitazione, per un periodo sufficiente a consentire il reincorporo del materiale nelle cellule, preferibilmente compreso tra 4 ore e 4 giorni, preferibilmente 72 ore, ad una temperatura compresa tra 2 e 8, preferibilmente a 4°C.

La soluzione acquosa ipotonica comprende preferibilmente:

- NaCl in concentrazioni inferiori a 0,12M;
- eventualmente, citrato di sodio in concentrazioni inferiori a 0,025M;

Preferibilmente, la suddetta soluzione ipotonica comprende NaCl 0,05M, citrato di sodio 0,005M.

Eventualmente, può essere aggiunto un opportuno agente antibatterico,

oppure polifosfati o para-benzoati.

La soluzione acquosa isotonica sarà preferibilmente una soluzione di NaCl avente concentrazione 0,9% (p/v), eventualmente comprendente anche basse concentrazioni di sodio citrato da 0,01 a 0,05M.

Preferibilmente, la soluzione isotonica secondo l'invenzione è una soluzione di NaCl 0,9% comprendente sodio citrato 0,025M.

Durante l'operazione di reinserimento intracellulare, con soluzione ipotonica, si sospendono le cellule (biomassa) nel mezzo ipotonico secondo l'invenzione, comprendente il principio (agente) o i principi attivi secondo l'invenzione da far assorbire all'interno dei microrganismi inattivati.

Si seguita ad aggiungere lentamente NaCl alla soluzione fino al raggiungimento della isotonicità.

Con questo trattamento, i microrganismi riacquistano la loro forma originaria. Il controllo del riassorbimento può venire condotto mediante il controllo della quantità di agente attivo ancora presente nella sospensione acquosa.

Per quanto riguarda l'operazione di reinserimento intracellulare, con la soluzione isotonica, si sospendono le cellule (biomassa) nel mezzo isotonico secondo l'invenzione, comprendente il principio (agente) o i principi attivi secondo l'invenzione da far assorbire all'interno dei microrganismi inattivati che riacquistano la loro forma originaria. Il controllo del riassorbimento può venire condotto mediante il controllo della quantità di agente attivo ancora presente nella sospensione acquosa isotonica.

Secondo un'altra realizzazione, la spremitura della fase (i) viene realizzata utilizzando l'ipertonicità dell'agente attivo. In questo caso, si prepara un agente farmacologicamente o nutrizionalmente attivo secondo l'invenzione in forma ipertonica. L'agente attivo ipertonico viene aggiunto, eventualmente in presenza di citrato sodico alla soluzione comprendente microrganismi e si ottiene lo svuotamento della componente endocellulare dalla cellula (microrganismo).

A questo punto, dopo eventuale inattivazione chimico-fisica dei microrganismi (fase II), si diluisce la soluzione ipertonica fino a portarla a valori di ipo- o isotonicità (fase III), permettendo l'ingresso dell'agente attivo nella cellula ed il rigonfiamento di quest'ultima.

Il vantaggio di questa procedura alternativa è che tutte le operazioni vengono effettuate nello stesso mezzo (nello stesso contenitore).

I valori delle sostanze che penetrano nella cellula sono particolarmente efficienti ed equivalenti in entrambe le due realizzazioni.

Secondo una ulteriore realizzazione l'introduzione del principio attivo secondo l'invenzione nel microrganismo avviene in presenza di una soluzione isotonica secondo le seguenti fasi:

- 1) si inattiva il microrganismo per via dermica, ad esempio a 60-65 °C per 30-120 min., preferibilmente a 65°C per 30 min.;
- 2) si risospendono le cellule inattivate in mezzo isotonico di NaCl contenente il principio attivo da incorporare;
- 3) si lascia sotto agitazione per 48-72 ore nelle stesse condizioni degli altri esempi
- 4) al termine si centrifuga, come negli altri esempi;

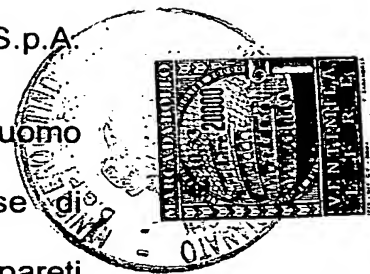
Una volta terminato l'ingresso dell'agente attivo nella cellula, secondo i processi della presente invenzione, è eventualmente possibile aggiungere una soluzione tampone, come stabilizzante per le cellule (dei pori di membrana), e quindi fermare o limitare la perdita (fuoriuscita) dell'agente attivo dalla cellula.

Il tampone utilizzato potrà essere una sospensione comprendere, per esempio, formaldeide o glutaraldeide.

Alternativamente, la stabilizzazione dei pori di membrana delle cellule può essere effettuata mediante trattamento per temperatura (60°-65° C per 30-120min, preferibilmente 60).

I microrganismi ottenuti dalla fase (iii) possono venire infine concentrati preferibilmente mediante filtrazione, fino a piccoli volumi di mezzo ipotonico, oppure possono venire usati direttamente per la somministrazione o nella preparazione di composizioni alimentari oppure separati per centrifugazione dal mezzo.

I microrganismi possono venire separati dal mezzo di crescita per filtrazione o centrifugazione, recuperando il supernatante. Il supernatante viene quindi concentrato e gli agenti attivi di interesse possono venire recuperati mediante precipitazione salina con solfato di ammonio, come descritto da Robert K. Scopes in Protein Purification, Principles and Practice, Cap. 3, pag. 39-52, Ed. Springer-Verlag, New York Inc., 1982. Il precipitato proteico può venire quindi separato per filtrazione, risospeso in acqua e sottoposto a dialisi con taglio molecolare a 2.000/5.000 Daltons contro acqua, per 48 ore, operando a freddo.



Dopo l'assunzione dei microrganismi dell'invenzione da parte dell'uomo o dell'animale, attraverso gli alimenti o il mangime, in fase di metabolizzazione a livello intestinale, la frammentazione delle pareti cellulari del microrganismo porta alla liberazione degli agenti attivi incorporati in esso. Gli agenti attivi così protetti, non essendo a contatto con fattori inattivanti esterni, mantengono inalterate le loro proprietà originarie.

Costituisce un ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso dei suddetti microrganismi inattivati contenenti agenti attivi in campo alimentare, sia umano che veterinario, e preferibilmente in zootecnia, nell'allevamento di animali da reddito.

Infine, costituiscono ulteriore oggetto della presente invenzione delle composizioni alimentari, utilizzabili nell'alimentazione sia umana che veterinaria, comprendenti uno o più microrganismi inattivati arricchiti di agenti attivi secondo l'invenzione, come sopra descritto, in associazione con alimenti convenzionali ed eventualmente in presenza di opportuni eccipienti e/o diluenti. La quantità di microrganismi da somministrare varia a seconda della specie animale trattata, della dieta seguita, dello stato di salute generale degli animali e delle condizioni di allevamento, ed è preferibilmente compresa tra 0,1 e 20 g/kg di mangime nell'animale da allevamento, e da 0,1 a 5 g/giorno nell'uomo. Per i polli, i microrganismi dell'invenzione vengono preferibilmente somministrati in quantità compresa tra 30 e 70 mg/giorno.

Le suddette composizioni sono preferibilmente utilizzate in campo zootecnico, in forma di premix o mangimi; infatti, le pareti cellulari dei

microrganismi sono in grado di proteggere le caratteristiche strutturali e di attività degli agenti attivi in esse contenuti, sia in fase di preparazione della miscela che durante il transito di essa attraverso l'apparato gastrico.

E' stato trovato che gli agenti attivi inseriti nei microrganismi secondo l'invenzione risultano particolarmente stabili alla temperatura e quindi sono particolarmente adatti a preparazioni che richiedono il riscaldamento della composizione. Questo risulta importante, ad esempio, nel caso in cui l'agente attivo venga mescolato con un alimento e prima dell'ingerimento da parte dell'uomo o animale, questa miscela alimentare venga riscaldata o portata all'ebollizione.

In particolare, come riportato nell'Esempio 5, si è visto che l'acido ascorbico contenuto nel microrganismo preparato secondo l'invenzione risulta termostabile anche a 120°C, mentre è noto in letteratura che l'acido ascorbico tale e quale si denatura facilmente a temperature molto più basse.

Parte sperimentale

La presente invenzione verrà ora descritta secondo particolari realizzazioni negli Esempi che seguono.

Esempio 1

Lieviti modificati per la incorporazione di acido ascorbico

Fase I) - 30 g di pasta di lievito (contenenti 10 g di lievito secco) di *Saccaromyces cerevisiae*, disponibile commercialmente, vengono sospesi in 170 g di una soluzione ipertonica di NaCl 2,0M (116,88 g/l di sodio cloruro e 29,41 g/l di trisodio citrato 2H₂O) e mantenuti a 25°C per

6 ore sotto leggera agitazione.

Fase II) - Le cellule risultano già inattivate dal trattamento iperosmotico della fase I) e quindi non è stata necessaria una ulteriore inattivazione mediante sistemi chimico-fisici.

Fase III) - Dalla sospensione ottenuta alla fase I) viene prelevata una aliquota di 80 g e questa viene centrifugata a 4000 giri/min per 15 minuti. Si lava il centrifugato ottenuto con 80 ml di soluzione isotonica di acido ascorbico (59,4 g/l), si recuperano le cellule che vengono riportate a 80 g con soluzione isotonica di acido ascorbico.

Si mantiene la sospensione per 6 ore a 25°C sotto leggera agitazione.

Le cellule ottenute possono essere conservate sino al momento dell'uso o testate per la quantità di acido ascorbico che è penetrato nelle cellule.

Test analitico delle sospensioni ottenute

Le sospensioni come precedentemente ottenute sono state testate per verificare la quantità di acido ascorbico che si è accumulato nelle cellule.

Fase IV) - La sospensione ottenuta alla fase III) viene centrifugata a 10000 giri. Il centrifugato viene lavato 2 volte con soluzione isotonica di sodio cloruro (0,9%) mantenendola in sospensione.

Fase V) - Il centrifugato viene portato a 80g con la soluzione ipertonica (NaCl 2,0M) usata per la fase I). Per completare la spremitura osmotica si mantiene la sospensione sotto leggera agitazione per 6 ore a 25°C.

Fase VI) - Si determina l'acido ascorbico presente in ciascuna soluzione per HPLC.

Fase VII) - Determinazione della vitalità delle cellule

Si procede con una piccola parte (1 g) del centrifugato ottenuto nella

fase IV) per gli accertamenti della vitalità delle cellule, utilizzando la tecnica microbiologica di fermentazione di saccarosio in soluzione isotonica al 9,25% e la conta dei germi vitali con Platecourt agar. Si usa il metodo di controllo della TVC (Total Viable Cells) comunemente noto e descritti nei testi di microbiologia normalmente consultati, come ad esempio nel Berkley's Manual, e nel Davis, Dulbecco, Trattato di Microbiologia (Piccin Ed. Padova).

Non ho altri dati sottomano ma dovrete averli in ufficio

Dati quantitativi (Prova 1NC-A)

Fase I Trattamento con soluzione ipertonica

| Prova | ceppo | soluzione | concentr. | tempo | temperatura |
|-------|----------------------|------------|-----------|-------|-------------|
| | <i>S. Cerevisiae</i> | ipertonico | NaCl | | |
| | Pesata [g]*/ | Pesata [g] | [%]* | [ore] | [°C] |
| 1NC-A | 15,00 | 185,00 | 11,69 | 6 | 25 |

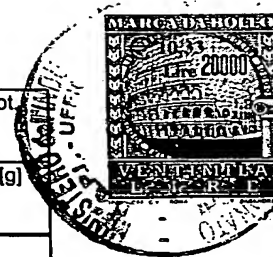
* / Pesata sul tal quale, perdita di essiccamento 63,40%

Fase III Trattamento con soluzione isotonica di acido ascorbico

| Prova | centrifugato | lavato con | centrifugato | aggiunto | tempo | temperatura |
|-------|--------------|---------------|--------------|---------------|-------|-------------|
| | | ac.asco isot. | | ac.asco isot. | | termostato |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | [ore] | [°C] |
| 1NC-A | 9,31 | 70,69 | 12,48 | 67,52 | 6 | 25 |

Fase IV Lavaggio con soluzione isotonica NaCl (0,9%)

| Prova | centrifugato | lavato-1 con | centrifugato | lavato-2 con | centrifugato | lavato-3 con |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|



| | | | | | | |
|-------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | | NaCl isot. | | NaCl isot. | | NaCl isot. |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] |
| 1NC-A | 10,2 | 69,80 | 10,37 | 69,63 | 10,27 | |

Fase V Trattamento con soluzione ipertonica per liberare l'ascorbato incorporato

| Prova | centrifugato | soluzione | centrifugato | tempo | temperatura |
|-------|--------------|---------------|--------------|-------|-------------|
| | | ipertonico ad | | | termostato |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | [ore] | [°C] |
| 1NC-A | 10,27 | | 8,68 | 6 | 25 |

Fase VI Elaborazione dati analitici di HPLC

soluz. finale

acque di lavaggio

| Area Std. | | Standard m | 1NC-C-A | 1NC-1-A | 1NC-2-A | |
|-----------|--------------|------------|----------|----------|----------|--|
| 2751,177 | area | 2755,622 | 1945,303 | 2780,081 | 245,6809 | |
| 2757,986 | Diluizione | 0,000500 | 0,9000 | 0,0200 | 0,0200 | |
| 2757,705 | mg/ml | 59,4 | 0,02330 | 1,49818 | 0,13240 | |
| | Peso liquido | | 76,00 | | | |
| | Peso lievito | | 4,00 | | | |

Valori riscontrati nelle soluzioni ipertonici finali e nel relativo

lavaggio precedente con soluzione fisiologica di sodio cloruro

soluz. finale

acque di lavaggio

| | | | | |
|----------|-------|-------|-------|--|
| mg C/ ml | 0,023 | 1,498 | 0,132 | |
|----------|-------|-------|-------|--|

| | | | | |
|------------|-------|--|--|--|
| mg C/ g *) | 0,443 | | | |
|------------|-------|--|--|--|

*) la quantità di ac. ascorbico liberato da 1g di lievito sul secco per spremitura osmotica

è stato evidenziato in grassetto.

Fase VII Risultati delle attività biologiche

| Prova | fermentaz. | fermentaz. | lieviti vivi | lieviti vivi | controllo |
|--------------|-----------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| | saccarosio* | saccarosio* | N° U. F. C. | N° U. F. C. | micro- |
| | dopo 24 h | dopo 1 sett. | dopo 24 h | dopo 1 sett. | scopico |
| 1NC-A | negativo | | | | |

* concentrazione Saccarosio 9,25% (isotonico)

Esempio 2

Lieviti modificati per la incorporazione di ossitettraciclina

Fase I) - 30 g di pasta di lievito (contenenti 10 g di lievito secco) di *Saccharomyces cerevisiae*, disponibile commercialmente, vengono sospesi in 170 g di una soluzione ipertonica di NaCl 2,0M (116,88 g/l di sodio cloruro e 29,41 g/l di trisodio citrato 2H₂O) e mantenuti a 25°C per 6 ore sotto leggera agitazione.

Fase II) - Le cellule risultano già inattivate dal trattamento iperosmotico della fase I) e quindi non è stata necessaria una ulteriore inattivazione mediante sistemi chimico-fisici.

Fase III) - Dalla sospensione ottenuta alla fase II) è stata prelevata una aliquota da 80 g e questa viene centrifugata a 4000 giri/min per 15 minuti. Si lava il centrifugato con 80 ml di soluzione isotonica di ossitettraciclina HCl (32,6 g/l) e acido citrico (27,6 g/l), si recuperano le cellule che vengono riportate a 80 g con soluzione isotonica come

sopra. Si mantengono le sospensioni per 6 ore a 25°C sotto leggera agitazione.

Le cellule ottenute possono essere conservate sino al momento dell'uso o testate per la quantità di ossitetraciclina che è penetrato nelle cellule.

Test analitico delle sospensioni ottenute

La sospensione come precedentemente ottenuta è stata testata per verificare la quantità di ossitetraciclina che si è accumulata nelle cellule.

Fase IV) - La sospensione ottenuta nella fase III) viene centrifugata a 10000 giri. Il centrifugato viene lavato 2 volte con soluzione isotonica di sodio cloruro (0,9%) mantenendola in sospensione per 10 minuti prima della centrifugazione.

Fase V) - Il centrifugato viene quindi portato a 80 g con la soluzione ipertonica (NaCl 2,0M) usata per la fase I). Per completare la spremitura osmotica si mantiene la sospensione sotto leggera agitazione per 6 ore a 25°C.

Fase VI) - Si determina l'ossitetraciclina HCl presente in ciascuna soluzione per HPLC.

Fase VII) - Determinazione della vitalità delle cellule

Si procede con una piccola parte (1 g) del centrifugato ottenuto nella fase IV) per gli accertamenti della vitalità delle cellule, utilizzando la tecnica microbiologica di fermentazione di saccarosio in soluzione isotonica a, 9,25% e la conta dei germi vitali con Platecourt agar.

Dati quantitativi (Prova 2NO-A)

Fase I Trattamento con soluzione ipertonica

| Prova | ceppo | soluzione | Concentr. | tempo | temperatura |
|-------|-------|-----------|-----------|-------|-------------|
| | | | | | |

| | | | | | |
|--|--------------|------------|-------|-------|------|
| | S.Cerevisiae | ipertonico | NaCl | | |
| | Pesata [g]*/ | Pesata [g] | [%] | [ore] | [°C] |
| | 30,00 | 170,00 | 11,69 | 6 | 25 |

*/ Perdita di essiccamento 63,40%.

Fase III Trattamento con soluzione isotonica
contenente ossitetraciclina HCl e acido
Citrico

| Prova | centrifugato | lavato con | Centrifugato | aggiunto | tempo | temperatura |
|-------|--------------|----------------|--------------|----------------|-------|-------------|
| | | ossitetracicl. | | ossitetracicl. | | termostato |
| | Pesata [g] | Pesata [g] */ | Pesata [g] | Pesata [g] | [ore] | [°C] |
| | 9,34 | 70,66 | 13,07 | 66,93 | 6 | 25 |

*/soluzione isotonica contenente 3,26% di ossitetraciclina HCl e 2,76% di acido citrico.

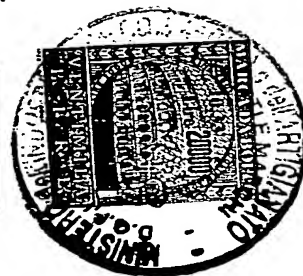
Fase IV Lavaggio con soluzione isotonica NaCl (0,9%)

| Prova | centrifugato | lavato-1 con | Centrifugato | lavato-2 con | centrifugato | lavato-3 con |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | NaCl isot. | | NaCl isot. | | NaCl isot. |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] |
| | 14,40 | 65,60 | 13,79 | 66,21 | 13,10 | |

Fase V Trattamento con soluzione ipertonica per liberare l'ossitetraciclina

| Prova | centrifugato | soluzione | centrifugato | tempo | temperatura |
|-------|--------------|---------------|--------------|-------|-------------|
| | | ipertonico ad | | | termostato |

| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | [ore] | [°C] |
|--|------------|------------|------------|-------|------|
| | 13,10 | | 9,05 | 6 | 25 |



Fase VI Elaborazione dati analitici di HPLC

Prova : 2NO-A

soluz. finale

acque di lavaggio

| Area Std. | | Standard m | | | | |
|-----------|--------------|------------|----------|----------|---------|--|
| 480,0892 | area | 480,6342 | 3308,995 | 696,7409 | 271,191 | |
| 481,285 | Diluizione | 0,001 | 0,900 | 0,020 | 0,020 | |
| 480,5278 | mg/ml | 32,6 | 0,249 | 2,363 | 0,920 | |
| | Peso liquido | | 76,00 | | | |
| | Peso lievito | | 4,00 | | | |

Valori riscontrati nelle soluzioni ipertonici finali e nei relativi

lavaggi precedenti con soluzione fisiologica di sodio cloruro

soluz. finale

acque di lavaggio

| | | | | |
|------------|-------|-------|-------|--|
| mg O/ ml | 0,249 | 2,363 | 0,920 | |
| mg O/ g *) | 4,738 | | | |

*) la quantità di ossitetradicina liberata da 1g di lievito sul secco per spremitura osmotica

è stato evidenziato in grassetto.

Fase VII Risultati delle attività biologiche

| Prova | fermentaz. | fermentaz. | lieviti vivi | lieviti vivi | contollo |
|-------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| | saccarosio* | saccarosio* | N° U. F. C. | N° U. F. C. | micro- |
| | dopo 24 h | dopo 1 sett. | dopo 24 h | dopo 1 sett. | scopico |
| | negativo | | | | |

l' concentrazione Saccarosio 9,25% (isotonico)

Esempio 3

Lieviti modificati per la incorporazione di sulfadimetossina sodica

Fase I) - 30 g di pasta di lievito (contenenti 10 g di lievito secco), di *Saccharomyces cerevisiae*, disponibile commercialmente, vengono sospesi in 170 g di una soluzione ipertonica di NaCl 2,0M (116,88 g/l di sodio cloruro e 29,41 g/l di trisodio citrato $2H_2O$) e mantenuti a 25°C per

6 ore sotto leggera agitazione.

Fase II) - Le cellule risultano già inattivate dal trattamento iperosmotico della fase I) e quindi non è stata necessaria una ulteriore inattivazione mediante sistemi chimico-fisici.

Fase III) - Dalla sospensione ottenuta alla fase I) si preleva una aliquota di 80 g e questa viene centrifugata a 4000 giri/min. per 15 minuti. Si lava il centrifugato con 80 ml di soluzione isotonica di sulfadimetossina sodica (51,7 g/l), si recuperano le cellule che vengono riportate a 80 g con soluzione isotonica di sulfadimetossina sodica e sodio citrato 0,025M. Si mantiene la sospensione per 6 ore a 25°C sotto leggera agitazione.

Le cellule ottenute possono essere conservate sino al momento dell'uso o testate per la quantità di sulfadimetossina che è penetrata nelle cellule.

Test analitico delle sospensioni ottenute

La sospensione come precedentemente ottenuta è stata testata per verificare la quantità di sulfadimetossina sodica che si è accumulata

nelle cellule.

Fase IV) - La sospensione della fase III) viene centrifugata a 10000 giri. Il centrifugato viene lavato 2 volte con soluzione isotonica di sodio cloruro (0,9%) mantenendola in sospensione per 10 minuti prima della centrifugazione.

Fase V) - Il centrifugato viene quindi portato a 80g con la soluzione ipertonica (NaCl 2,0M) usata per la fase I). Per completare la spremitura osmotica si mantengono le sospensioni sotto leggera agitazione per 6 ore a 25°C.

Fase VI) - Si determina la sulfadimetossina sodica presente in ciascuna soluzione per HPLC.

Fase VII) - *Determinazione della vitalità delle cellule*

Si procede con una piccola parte (1 g) del centrifugato ottenuto nella fase IV) per gli accertamenti della vitalità delle cellule, utilizzando la tecnica microbiologica di fermentazione di saccarosio in soluzione isotonica a, 9,25% e la conta dei germi vitali con Platecourt agar.

Dati quantitativi (prova 3NS1-A)

Fase I Trattamento con soluzione ipertonica

| Prova | ceppo | soluzione | concentr. | tempo | temperatura |
|-------|--------------|------------|-----------|-------|-------------|
| | S.Cerevisiae | ipertonico | NaCl | | |
| | Pesata [g]*/ | Pesata [g] | [%] | [ore] | [°C] |
| | 30,00 | 170,00 | 11,69 | 6 | 25 |

* / Pesata sul tal quale, perdita di essiccamento 63,40%

Fase III Trattamento con soluzione isotonica di sulfadim tossina sodica

| Prova | centrifugat | lavato con | centrifugato | aggiunto | tempo | temperatura |
|-------|-------------|------------|--------------|----------|-------|-------------|
| | | | | | | |

| | | | | | | |
|--|------------|---------------|------------|---------------|-------|------------|
| | | | | | | ura |
| | | ac.asco isot. | | ac.asco isot. | | termostato |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | [ore] | [°C] |
| | 9,62 | 70,38 | 12,42 | 67,58 | 6 | 25 |

Fase IV Lavaggio con soluzione isotonica NaCl (0,9%)

| | | | | | | |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| Prova | centrifugato | lavato-1 con | centrifugato | lavato-2 con | centrifugato | lavato-3 con |
| | | NaCl isot. | | NaCl isot. | | NaCl isot. |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] |
| | 13,57 | 66,43 | 13,32 | 66,68 | 13,25 | |

Fase V Trattamento con soluzione ipertonica per liberare la sulfadimetossina incorporata

| | | | | | |
|-------|--------------|---------------|--------------|-------|-------------|
| Prova | centrifugato | soluzione | centrifugato | tempo | temperatura |
| | | ipertonico ad | | | termostato |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | [ore] | [°C] |
| | 13,25 | | 9,92 | 6 | 25 |

Fase VI Elaborazione dati analitici di HPLC

soluzione finale

acque di lavaggio

| | | | | | | |
|-----------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|--|
| Area Std. | | Standard m | 3NS1-S1-A | 3NS1-S1-A | 3NS1-S2-A | |
| 1740,617 | area | 1741,128 | 2266,977 | 2990,862 | 285,2832 | |
| 1742,183 | Diluizione | 0,001 | 0,900 | 0,020 | 0,020 | |

| | | | | | | |
|----------|--------------|------|-------|-------|-------|--|
| 1740,585 | mg/ml | 51,7 | 0,075 | 4,440 | 0,424 | |
| | Peso liquido | | 76,00 | | | |
| | Peso lievito | | 4,00 | | | |

Valori riscontrati nelle soluzioni ipertonici finali e nei relativi

lavaggi precedenti con soluzione fisiologica di sodio cloruro

soluz. finale

acque di lavaggio

| | | | | |
|-------------|-------|-------|-------|--|
| mg S1/ ml | 0,075 | 4,440 | 0,424 | |
| mg S1/ g *) | 1,421 | | | |

*) la quantità di sulfadimetossina liberato da 1g di lievito sul secco per spremitura osmotica

è stato evidenziato in grassetto.

Fase VII Risultati delle attività biologiche

| Prova | fermentaz. | fermentaz. | lieviti vivi | lieviti vivi | contollo |
|-------|-------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| | saccarosio* | saccarosio* | N° U. F. C. | N° U. F. C. | micro- |
| | dopo 24 h. | dopo 1 sett. | dopo 24 h | dopo 1 sett. | scopico |
| | negativo | | | | |

* concentrazione Saccarosio 9,25% (isotonico)

Esempio 4

Lieviti modificati per incorporazione di sulfadimetossina sodica (ipertonicità dovuta al farmaco)

Fase I) - A 30 g di pasta di lievito (contenenti 20 g di acqua) di *Saccharomyces cerevisiae*, disponibile commercialmente, vengono aggiunti 3,32 g di sulfadimetossina sodica e 0,29 g di trisodio citrato

2H₂O e 8,5 g di acqua sotto leggera agitazione. Si mantiene la sospensione ottenuta a 25°C per 6 ore.

Fase II) - Le cellule risultano già inattivate e quindi è stata necessaria ulteriore inattivazione mediante sistemi chimico-fisici.

Fase III) - La sospensione ottenuta alla fase I) viene diluita con 30,61 g di acqua distillata all'isotonicità e si mantiene la sospensione sotto leggera agitazione per 6 ore a 25°C.

Le cellule ottenute possono essere conservate sino al momento dell'uso

~~o testate per la quantità di sulfadimetossina che è penetrata nelle~~
cellule.

Test analitico della sospensione ottenuta

Le sospensioni come precedentemente ottenute sono state testate per verificare la quantità di sulfadimetossina sodica che si è accumulato nelle cellule.

Fase IV) - Si diluisce, per motivi analitici, la sospensione ottenuta nella fase III) con una soluzione isotonica di sulfadimetossina sodica (5,17%) a 200 g. Si preleva una aliquota di 80 g di sospensione. Si centrifuga a 10000 giri la sospensione e si lava il centrifugato 2 volte con una soluzione isotonica di sodio cloruro (0,9%). Si agita la sospensione per 10 minuti prima di ogni lavaggio.

Fase V) - Il centrifugato viene portato a 80g con una soluzione ipertonica NaCl 2,0M (116,88 g/l di sodio cloruro e 29,41 g/l di trisodiocitrato 2H₂O) sotto leggera agitazione per 6 ore a 25°C.

Fase VI) - Si determina la sulfadimetossina sodica presente in soluzione per HPLC.

I valori ottenuti sono simili a quelli ottenuti con l'Esempio precedente.

Fase VII) - Determinazione della vitalità delle cellule

Si procede con una piccola parte (1 g) del centrifugato ottenuto nella fase IV) per l'accertamento della vitalità delle cellule, utilizzando la tecnica microbiologica di fermentazione di saccarosio in soluzione isotonica a, 9,25% e la conta dei germi vitali con Platecourt agar.

Dati quantitativi: (Prova 4NS1-A)

Fase I Trattamento con soluzione ipertonica di sulfadimetossina sodica

| Prova | ceppo | aggiunta | aggiunta | aggiunta | concentr. | tempo | temperatura |
|-------|--------------|------------|------------|------------|-----------|-------|-------------|
| | S.Cerevisiae | sulfadim. | Na-citrato | acqua | sulfadim. | | |
| | Pesata [g]*/ | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | [%] | [ore] | [°C] |
| | 30,00 | 3,32 | 0,29 | 8,50 | 10,34 | 6 | 25 |

* / Pesata sul tal quale (contenenti 10 g di lievito secco e 20 g di acqua)

Fase III Trattamento con soluzione isotonica di sulfadimetossina sodica

| Prova | aggiunta | concentr. | tempo | temperatura |
|-------|------------|-----------|-------|-------------|
| | acqua | sulfadim. | | termostato |
| | Pesata [g] | [%] | [ore] | [°C] |
| | 30,61 | 5,17 | 6 | 25 |

per motivi analitici si diluisce la sospensione ottenuta nella fase II a 200 g con soluzione isotonica di sulfadimetossina sodica. Si prelevano 80 g di sospensione che viene centrifugata.

Fase IV Lavaggio con soluzione isotonica di NaCl (0,9%)

| Prova | centrifugato | lavato-1 con | centrifugato | lavato-2 con | centrifugato | lavato-3 con |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| | | NaCl isot. | | NaCl isot. | | NaCl isot. |

| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] |
|--|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | 16,25 | 63,75 | 15,81 | 64,19 | 15,99 | |

Fase V Trattamento con soluzione ipertonica */ per liberare la sulfadimetossina incorporata nelle cellule.

| Prova | centrifugato | soluzione | tempo | temperatura | centrifugato |
|-------|--------------|---------------|-------|-------------|--------------|
| | | ipertonico ad | | termostato | |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | [ore] | [°C] | Pesata [g] |
| | 15,99 | | 6 | 25 | 11,81 |

*/soluzione ipertonica (116,88 g/l di sodio cloruro e 29,41 g/l di trisodio citrato 2H₂O)

Fase VI Elaborazione dati analitici di HPLC

soluz. finale

acque di lavaggio

| Area Std. | | Standard m. | 4NS1-S1-A | 4NS1-1-A | 4NS1-2-A | |
|-----------|--------------|-------------|-----------|----------|----------|--|
| 1779,899 | area | 1782,36 | 2049,225 | 2579,098 | 189,6448 | |
| 1783,757 | Diluizione | 0,001000 | 0,9000 | 0,0200 | 0,0200 | |
| 1783,423 | mg/ml | 51,7 | 0,06605 | 3,74053 | 0,27505 | |
| | Peso liquido | | 76,00 | | | |
| | Peso lievito | | 4,00 | | | |

Valori riscontrati nelle soluzioni ipertonici finali e nei relativi

lavaggi precedenti con soluzione fisiologica di sodio cloruro

soluz. finale

acque di lavaggio

| | | | | |
|------------|-------|-------|-------|--|
| mg S1/ml * | 0,066 | 3,741 | 0,275 | |
| mg S1/g *) | 1,255 | | | |

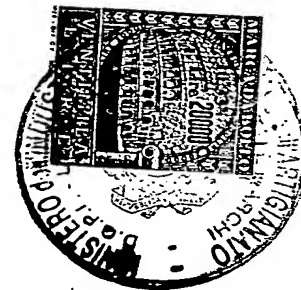
*) la quantità di sulfadimetossina liberato da 1g di lievito sul secco per spremitura osmotica

è stato evidenziato in grassetto.

Fase VII Risultati delle attività biologiche

| Prova | fermentaz. | fermentaz. | lieviti vivi | lieviti vivi | controllo |
|-------|-------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| | saccarosio* | saccarosio* | N° U. F. C. | N° U. F. C. | micro- |
| | dopo 24 h | dopo 1 sett. | dopo 24 h | dopo 1 sett. | scopico |
| | negativo | | | | |

* concentrazione Saccarosio 9,25% (isotonico)



Esempio 5

Lieviti modificati per la incorporazione di acido ascorbico e stabilizzazione termica

Viene ripetuta l'incorporazione come nell'esempio 1, con in più la stabilizzazione termica del lievito modificato.

Fase I) - 30 g di pasta di lievito (contenenti 10 g di lievito secco) di *Saccaromyces cerevisiae*, disponibile commercialmente, vengono sospesi in 170 g di una soluzione ipertonica di NaCl 2,0M (116,88 g/l di sodio cloruro e 29,41 g/l di trisodio citrato 2H₂O) e mantenuti a 25°C per 6 ore sotto leggera agitazione.

Fase II) - Le cellule risultano già inattivate dal trattamento iperosmotico della fase I) e quindi non è stata necessaria una ulteriore inattivazione mediante sistemi chimico-fisici.

Fase III) - Dalla sospensione ottenuta alla fase I) viene prelevata una aliquota di 80 g e questa viene centrifugata a 4000 giri/min per 15 minuti. Si lava il centrifugato ottenuto con 80 ml di soluzione isotonica di acido ascorbico (59,4 g/l), si recuperano le cellule che vengono riportate

a 80 g con soluzione isotonica di acido ascorbico.

Si mantiene la sospensione per 6 ore a 25°C sotto leggera agitazione.

Le cellule ottenute possono essere conservate sino al momento dell'uso o testate per la quantità di acido ascorbico che è penetrato nelle cellule.

Test analitico delle sospensioni ottenute

Le sospensioni come precedentemente ottenute sono state testate per verificare la quantità di acido ascorbico che si è accumulato nelle cellule.

Fase IV) - La sospensione ottenuta alla fase III) viene centrifugata a 10000 giri. Il centrifugato viene lavato 2 volte con soluzione isotonica di sodio cloruro (0,9%) mantenendola in sospensione per 10 minuti prima della centrifugazione. Si essicca il centrifugato su essicante gelicagel (gel di silica) sotto vuoto a temperatura ambiente.

Fase V) - 1 g di lievito essiccato (A) tal quale ed 1 g di lievito essiccato (B) riscaldato per 15 minuti a 120°C vengono trattati con 10 ml di soluzione ipertonica come alla fase I). Per completare la spremitura osmotica si mantiene la sospensione sotto leggera agitazione per 6 ore a 25°C.

Fase VI) - Si determina l'acido ascorbico presente nelle acque di lavaggio per HPLC.

Fase VII) - Determinazione della vitalità delle cellule

Si procede con una piccola parte (1 g) dei centrifugati ottenuti nella fase IV) per gli accertamenti della vitalità delle cellule, utilizzando la tecnica microbiologica di fermentazione di saccarosio in soluzione isotonica al 9,25% e la conta dei germi vitali con Platecourt agar

Dati quantitativi: (Prova 5NC)

Fase I Trattamento con soluzione ipertonica

| Prova | Ceppo | soluzione | concentr. | tempo | temperatura |
|-------|--------------|------------|-----------|-------|-------------|
| | S.Cerevisiae | ipertonico | NaCl | | |
| | Pesata [g]*/ | Pesata [g] | [%] | [ore] | [°C] |
| | 15,00 | 185,00 | 11,69 | 6 | 25 |

*/ Pesata sul tal quale

Fase III Trattamento con soluzione isotonica di acido ascorbico

| Prova | centrifugato | lavato con | centrifugato | aggiunto | tempo | temperatura |
|-------|--------------|---------------|--------------|---------------|-------|-------------|
| | | ac.asco isot. | | ac.asco isot. | | termostato |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | [ore] | [°C] |
| | 9,52 | 70,48 | 12,81 | 67,19 | 6 | 25 |

Fase IV Lavaggio con soluzione isotonica di NaCl (0,9%) ed essiccamento

| Prova | centrifugato | lavato-1 con | centrifugato | lavato-2 con | centrifugato | lievito |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| | | NaCl isot. | | NaCl isot. | | essiccato |
| | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] | Pesata [g] */ |
| | 10,86 | 69,14 | 10,77 | 69,23 | 10,85 | 2,81 |

*/ perdita causata dal trasferimento in capsula di essiccamento

Fase V Trattamento con soluzione ipertonica per liberare l'ascorbato incorporato

| Prova | lievito | soluzione | tempo | temperatura |
|-------|-----------|---------------|-------|-------------|
| | essiccato | ipertonico ad | | termostato |

| | Pesata [g] | Pesata [g] | [ore] | [°C] |
|--|------------|------------|-------|------|
| | 1,17 | | 6 | 25 |
| | 1,00 | 11,00 | | |

Fase VI Elaborazione dati analitici di HPLC**Prova : prodotto essiccato sotto vuoto su silicagel**

soluz. finale

acque di lavaggio

| Area Std. | | Standard m | 5NC-C-A | 5NC-1-A | 5NC-2-A | |
|-----------|--------------|------------|----------|----------|----------|--|
| 3176,883 | area | 3182,274 | 7760,433 | 3111,097 | 314,5027 | |
| 3187,771 | Diluizione | 0,000500 | 0,4500 | 0,0200 | 0,0200 | |
| 3182,169 | mg/ml | 5974 | 0,16095 | 1,45179 | 0,14676 | |
| | Peso liquido | | 10,00 | | | |
| | Peso lievito | | 1,17 | | | |

Valori riscontrati nelle soluzioni ipertoniche finali e nei relativi

lavaggi precedenti con soluzione fisiologica di sodio cloruro

soluz. finale

acque di lavaggio

| | | | | |
|------------|------|-------|-------|--|
| mg C/ ml | 0,16 | 1,452 | 0,147 | |
| mg C/ g *) | 1,38 | | | |

*) la quantità di ac. ascorbico liberato da 1g. di lievito sul secco per spremitura osmotica

è stato evidenziato in grassetto.

Prova : prodotto essiccato sotto vuoto su silicagel dopo riscaldamento**a 120°C per 15 minuti**

soluz. finale

| Area Std. | | Standard | 5NC-C-B | |
|-----------|--|----------|---------|--|
|-----------|--|----------|---------|--|

| | | | | |
|----------|--------------|----------|----------|--|
| 3176,883 | area | 3182,274 | 6305,303 | |
| 3187,771 | Diluizione | 0,000500 | 0,450 | |
| 3182,169 | mg/ml | 59,4 | 0,131 | |
| | Peso liquido | | 10,00 | |
| | Peso lievito | | 1,00 | |

Valore riscontrato nella soluzione ipertonica finale

soluz. finale

| | |
|------------|------|
| mg C/ ml | 0,13 |
| mg C/ g *) | 1,31 |

*) la quantità di ac. ascorbico liberato da 1g di lievito sul secco per spremitura osmotica

è stato evidenziato in grassetto.

Fase VII Risultati delle attività biologiche

| Prova | fermentaz. | fermentaz. | lieviti vivi | lieviti vivi | controllo |
|-------|-------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| | saccarosio* | saccarosio* | N° U. F. C. | N° U. F. C. | micro- |
| | dopo 24 h | dopo 1 sett. | dopo 24 h | dopo 1 sett. | scopico |
| | negativo | | | | |

* concentrazione Saccarosio 9,25% (isotonico)

Esempio 6

Lieviti modificati per la incorporazione di acido ascorbico in soluzione isotonica

Fase 1) 30 g di pasta di lievito come nell'esempio 5, vengono sciolti in soluzione acquosa ed il lievito inattivato per via termica, a 65°C. per 30 minuti.

Fase 2) le cellule inattivate vengono risospese in mezzo isotónico (80 ml) di NaCl 0,9% comprendente l'acido ascorbico (59,4 g/l) da incorporare;

Fase 3) si lascia sotto agitazione per 60 ore nelle stesse condizioni degli altri esempi;

Fase 4) al termine si centrifuga, come negli altri esempi;

Fase 5) si tampona con una soluzione di glutaraldeide all'1%, come stabilizzante per le cellule, e quindi fermare o limitare la perdita (fuoriuscita) dell'acido ascorbico dalla cellula.

Dati quantitativi: (Prova 6NC)

Elaborazione dati analitici di HPLC

Prova 6NC

soluz. finale

acque di lavaggio

| Area Std. | | Standard m | 6NC-C-A | 6NC-1-A | | |
|-----------|--------------|------------|----------|----------|--|--|
| 1783,711 | area | 1786,532 | 1174,112 | 2158,851 | | |
| 1789,040 | Diluizione | 0,001 | 0,900 | 0,0200 | | |
| 1786,845 | mg/ml | 51,7 | 0,038 | 3,124 | | |
| | Peso liquido | | 76,00 | | | |
| | Peso lievito | | 4,00 | | | |

soluz. finale

acque di lavaggio

| | | | | |
|-----------|-------|-------|--|--|
| mg C/ml | 0,038 | 3,124 | | |
| mg C/g *) | 0,717 | | | |

*) la quantità di ac. ascorbico lib. rato da 1g di li. vito sul secco per spremitura osmotica

è stato evidenziato in grassetto.

I **Risultati delle attività biologiche**

| Prova | fermentaz. | fermentaz. | lieviti vivi | lieviti vivi | controllo |
|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-----------|
| | saccarosio* | saccarosio* | N° U. F. C. | N° U. F. C. | micro- |
| | dopo 24 h | dopo 1 sett. | dopo 24 h | dopo 1 sett. | scopico |
| 6NC | | | | | |

Esempio 7

Le cellule ottenute dalla fase III) di ciascuno degli Esempi 1-6 vengono tamponate usando formaldeide.

Si prepara una sospensione con 10 g di cellule per 100 ml di acqua e si mantiene sotto agitazione aggiungendo 5 ml di una soluzione di HCHO diluita 1:10 ml. Si continua l'agitazione per 2 ore, si lavano le cellule con acqua, per centrifugazione, per eliminare l'eccesso di HCHO del non reagito.

Il trattamento eseguito su porzioni di lieviti incorporati ottenuti dagli esperimenti precedenti ha consentito di incrementare la quota di principio attivo all'interno della cellula del 15% mediamente, riducendo nel contempo la quota rilevabile nei lavaggi per il quantitativo corrispondente.

Esempio 8

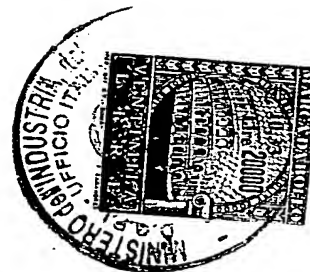
Le cellule ottenute dalla fase III) di ciascuno degli Esempi 1-6 vengono tamponate usando glutaraldeide

Si prepara una sospensione con 10 g di cellule per 100 ml di acqua e si tratta con 1 ml di una soluzione di glutaraldeide all'1%. Si lascia reagire

per 5 minuti, sotto agitazione.

Si lavano le cellule con acqua, per centrifugazione, per eliminare l'eccesso di glutaraldeide non reagito

Il trattamento eseguito su porzioni di lieviti incorporati ottenuti dagli esperimenti precedenti ha consentito di incrementare la quota di principio attivo all'interno della cellula del 25% mediamente, riducendo nel contempo la quota rilevabile nei lavaggi per il quantitativo corrispondente



RIVENDICAZIONI

1. Microrganismo inattivato comprendente uno o più sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica.
2. Microrganismo secondo la rivendicazione 1, caratterizzato dal fatto che detto microrganismo è *Saccharomyces cerevisiae*.
3. Microrganismo secondo le rivendicazioni 1-2, caratterizzato dal fatto che detta sostanza solubile e/o solubilizzabile ad attività farmacologica è ossitetraciclina.
4. Microrganismo secondo le rivendicazioni 1-2, caratterizzato dal fatto che detta sostanza solubile e/o solubilizzabile ad attività farmacologica è sulfidimetossina sodica.
5. Microrganismo secondo le rivendicazioni 1-2, caratterizzato dal fatto che detta sostanza solubile e/o solubilizzabile ad attività farmacologica è un vaccino.
6. Microrganismo secondo le rivendicazioni 1-2, caratterizzato dal fatto che detta sostanza nutrizionale ad attività farmacologica è acido ascorbico.
7. Microrganismo secondo le rivendicazioni 1-2, caratterizzato dal fatto che detta sostanza nutrizionale ad attività farmacologica è la vitamina B12.
8. Microrganismo comprendente una o più sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica secondo le rivendicazioni 3-7.
9. Microrganismo secondo le rivendicazioni 1-7, comprendente sostanze

nutrizionali ad attività farmacologica quali componenti di qualsiasi alimento o bevanda per uso umano o animale.

10. Microrganismo secondo la rivendicazione 10, dove detto alimento è specifico per i pesci.
11. Microrganismo secondo la rivendicazione 11, dove detto alimento è specifico per le prime fasi della crescita dei pesci.
12. Microrganismo secondo le rivendicazioni 10-11, dove detta sostanza nutrizionale è acido ascorbico
13. Composizione alimentare comprendente una quantità efficace di uno o più organismi inattivati secondo le rivendicazioni 1-12.
14. Uso di uno o più microrganismi inattivati secondo le rivendicazioni 1-12, nell'alimentazione umana o veterinaria.
15. Uso dei microrganismi secondo le rivendicazioni 1-12, come componenti di mangimi o premix in zootecnia.
16. Uso secondo le rivendicazioni 10-12 per l'alimentazione dei pesci.
17. Processo per la preparazione di microrganismi inattivati comprendenti uno o più sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica secondo le rivendicazioni 1-12, comprendente seguenti le fasi:
 - i) fuoriuscita della massa endocellulare di un opportuno microrganismo, mediante trattamento iperosmotico, e separazione della massa endocellulare fuoriuscita;
 - ii) eventuale inattivazione del microrganismo ottenuto alla fase i) per via chimica o fisica, lasciando inalterata la membrana esterna del microrganismo stesso;

iii) inserimento intracellulare di uno o più sostanze solubili e/o solubilizzabili ad attività farmacologica e/o sostanze nutrizionali ad attività farmacologica nel microrganismo inattivato ottenuto allo stadio i) o ii) mediante trattamento ipo- o isoosmotico.

18. Processo per la preparazione di microrganismi inattivati secondo le rivendicazioni 1-12, caratterizzato dal fatto che:

la fuoriuscita della massa endocellulare della fase I) è ottenuta mediante ipertonicità della sostanza farmacologicamente attiva;

avviene l'eventuale inattivazione per via chimica o fisica del microrganismo;

e detta sostanza farmacologicamente attiva già presente in soluzione penetra nel microrganismo nella fase (iii) con il cambiamento della soluzione a ipo- isotonicità.

19. Processo per la preparazione di microrganismi inattivati descritti alle rivendicazioni 1-12, secondo le seguenti fasi:

1) si inattiva il microrganismo per via termica, a 60-65 °C per 30-120 minuti;

2) si risospendono le cellule del microrganismo inattivate in mezzo isotonico comprendente il principio attivo da incorporare;

3) si lascia sotto agitazione per 48-72 ore;

4) al termine si centrifuga;

5) eventualmente si effettua la fase di tamponamento con formalina e/o glutaraldeide.

20. Processo secondo le rivendicazione 17-19, caratterizzata dal fatto che detto trattamento iperosmotico è ottenuto mediante una soluzione

ipertonica comprendente:

- NaCl in concentrazioni superiori a 0,2M;
- eventualmente sodio citrato 0,03 - 0,07M.

21. Processo secondo le rivendicazioni 17-19, in cui detto trattamento ipoosmotico è ottenuto mediante una soluzione ipotonica comprendente:

- NaCl in concentrazioni inferiori a 0,12M;
- eventualmente citrato di sodio in concentrazioni inferiori a 0,025M.

21. Processo secondo le rivendicazioni 17-19, in cui detto trattamento isotonico è ottenuto mediante una soluzione isotonica NaCl 0,9%, eventualment ecomprendente sodio citrato 0,025M.

22. Processo secondo le rivendicazioni 17-21, in cui

- detta soluzione ipertonica è NaCl 2,0M, e sodio citrato 0,05M;
- detta soluzione ipotonica è NaCl 0,05M e sodio citrato 0,005M;

23. Processo secondo le rivendicazioni 17-21, in cui

- detta detta soluzione ipertonica è NaCl 2,0M, e sodio citrato 0,05M;
- detta soluzione isotonica è NaCl 0,9% e sodio citrato 0,025M.

(MAT) *MA*

Milano, li 22 Aprile 1998

p. ECOSER Srl

Il Mandatario

[Signature]
Dr. Diego Pallini

NOTARBARTOLO & GERVASI S.p.A.

